UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1937-1938 N° 177

ÉTUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES ACIDES OXYPROTÉIQUES URINAIRES

THÈSE

15 JAN. 1938

Présentée et soutenue publiquement le

à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université

(Mention Pharmacie)

par

Maurice GRANGE

Pharmacien

Examinateurs de la Thèse :

MM. C. LAPP, Professeur, Président
Y. VOLMAR, Professeur
P. CORDIER, Chargé de cours
} Juges

LIMOGES
Imprimerie A. Bontemps
—
1937

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1937-1938 N° 177

ÉTUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES ACIDES OXYPROTÉIQUES URINAIRES

THÈSE

15 JAN. 1938

Présentée et soutenue publiquement le

à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université

(Mention Pharmacie)

par

Maurice GRANGE

Pharmacien

Examinateurs de la Thèse :

MM. C. LAPP, Professeur, Président
Y. VOLMAR, Professeur
P. CORDIER, Chargé de cours } Juges

LIMOGES
Imprimerie A. Bontemps

1937

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

Administration

MM. A SARTORY, *Doyen*, C. ✲, I. ⸙, C. ⸎.
Y. VOLMAR, *Assesseur*, ⸙.
CUVIER, *Secrétaire*, I. ⸙.

Doyen honoraire

M. JADIN, O. ✲, I. ⸙, ⸎.

Professeurs

MM.	
A. SARTORY, C. ✲, I. ⸙, C. ⸎	Bactériologie.
LAVIALLE, ✲, I. ⸙, ⸎	Botanique.
VOLMAR, I. ⸙	Chimie organique.
GUILLAUME, ✲, ⸎, I. ⸙, ⸎	Pharmacie galénique.
LAPP, I. ⸙	Chimie analytique.
CORDIER, chargé de cours, ⸙	Pharmacie chimique.
R. SARTORY, ch. de cours, ⸙	Matière médicale.

Professeur honoraire

M. JADIN, O. ✲, I. ⸙, ⸎.

Cours complémentaires

MM.	
A. SARTORY	Hygiène.
LAVIALLE	Hydrologie.
VOLMAR	Chimie minérale.
GUILLAUME	Zoologie.
LAPP	Physique.
EISENMANN	Législation et Déontologie.
CORDIER	Chimie biologique.
R. SARTORY	Cryptogamie.
DUQUENOIS	Toxicologie.

Chefs de travaux pratiques

MM.	
R. SARTORY	Bactériologie et Parasitologie.
COLLARD, I. ⸙, ⸎	Chimie pharmaceutique.
BOHN, A. ⸙	Histoire naturelle.
DUQUENOIS	Chimie et Physique.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A Mon Président de Thèse

Monsieur le Professeur Ch. LAPP

Professeur de Chimie Analytique.

Hommage de respectueuse reconnaissance.

A mes Juges

Monsieur le Professeur Y. VOLMAR

Monsieur le Professeur P. CORDIER

Hommage de profonde gratitude.

A la mémoire de

Monsieur le Doyen LOBSTEIN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548006_0026

A MON PÈRE

A MA MÈRE

En témoignage de ma filiale affection.

A MA FEMME

A MA SŒUR

A MES PARENTS ET AMIS.

INTRODUCTION

Dans les éléments de l'urine, que l'on comprend sous le nom d'indosé urinaire, se trouve, et pour la plus grande part, un ensemble de corps azotés et sulfurés riches en oxygène. Ils résultent de l'oxydation des polypeptides et constituent la plus grosse proportion des déchets azotés et sulfurés. Ils en représentent 4,3 à 6,8 %, c'est-à-dire un poids de 6 grammes au moins par vingt-quatre heures. Dans les urines pathologiques (fièvre typhoïde, maladie de foie, intoxication par le phosphore) leurs quantités peuvent être très augmentées.

Ils ont été aussi signalés en grande quantité dans le sérum sanguin.

St. Bondzynski, St. Dombrowski et K. Panek (1), qui les ont découverts, en même temps que l'urochrome, les ont nommés : acide oxyprotéique, acide antoxyprotéique et acide alloxyprotéique. Et ces auteurs ont vu en eux les agents de la diazoréaction d'Ehrlich dans l'urine.

Bien que de nombreux travaux aient déjà paru sur ces composés, certains auteurs ne sont pas d'accord au sujet de leur constitution. Tel, M. Edelbacher

(2 et 5) qui conclut à la constitution de ces produits par de l'urée ou un produit analogue à l'uréine de Moor. Une autre communication de E. Freund et Anna Sittenberger (6), nous présente l'acide oxyprotéique avec une constitution tout à fait différente de celle proposée par Bondzynski. Mais ayant fait subir à l'urine un traitement compliqué et différent de celui employé par ce dernier auteur, Giedroyc (7) prétend qu'ils n'ont obtenu que des produits résultant du dédoublement et de l'oxydation de l'acide oxyprotéique.

D'autre part, ces composés, comme d'ailleurs les autres constituants de l'indosé urinaire, ne sont pas délaissés dans les dosages courants et en clinique, parce que inintéressants, mais parce que les extractions et dosages en sont très longs et difficiles.

Cette difficulté réside dans plusieurs points. D'abord dans la solubilité de leurs sels suivant la réaction du milieu ; pour les obtenir purs il faut éliminer rigoureusement tous les autres ingrédients de l'urine, qui malgré beaucoup de précautions restent souvent inclus dans les précipités (sels de baryum ou de mercure par exemple) ou précipitent par les mêmes réactifs que les corps qui nous intéressent. De plus ce sont des produits qui en solution sont très altérables : il faut donc opérer très rapidement. Ils sont très instables, une certaine température ou un oxydant tel que le permanganate de potasse les décomposent facilement.

Pour l'étude de ces produits nous avons cru raisonnable de nous en tenir aux méthodes d'extraction et aux expériences de St. Bondzynski qui les a découverts (8).

La constitution chimique de ces acides étant mal

connue, leur basicité, leur ionisation, leur stabilité en solution acide ou basique n'étant pas déterminées, nous nous sommes proposés d'extraire une quantité suffisante de ces produits qui nous permettent de faire les essais que nous décrivons ici, et font l'objet de la présente thèse. Les méthodes de mesure du pH et de la cataphorèse étant appliquées avec intérêt aux produits de la chimie biologique, nous avons basé sur elles, l'étude physico-chimique des produits extraits d'urines normales masculine, féminine et d'enfant.

L'étude des acides oxyprotéiques dans les urines pathologiques, présente certainement un intérêt très vif vu l'influence des maladies et intoxications qui réagissent sur le métabolisme des albuminoïdes ; mais l'ampleur du sujet nous a contraint à nous en tenir aux urines normales.

Il serait de même très intéressant de comparer toujours par les méthodes de mesure du pH et de la cataphorèse la basicité et l'altérabilité de ces protéines naturelles avec celles des produits résultant de l'oxydation artificielle par le permanganate de potasse, des corps protéiques et en particulier de l'albumine de l'œuf. Ces produits d'oxydation ont des points communs par les propriétés chimiques de leurs sels, mais ces derniers semblent plus stables puisque l'acide pur paraît avoir été obtenu (18).

*
* *

Avant d'entrer dans le vif du sujet nous tenons à remercier tout particulièrement M. le Professeur Lapp, d'avoir bien voulu nous diriger dans ce travail et de

nous avoir toujours prodigué ses conseils éclairés. Nous conserverons de son accueil bienveillant et de son enseignement un respectueux souvenir.

A MM. les Professeurs Y. Volmar et P. Cordier vont également nos sentiments de profonde gratitude pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'être de notre jury de thèse.

Nous remercions M. Guillemet qui s'est très aimablement mis à notre disposition pour nos micro-analyses.

A la mémoire de notre très respecté et regretté Doyen, M. A. Lobstein, nous tenons à adresser ici un respectueux hommage.

De notre séjour à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg nous emporterons un excellent souvenir, aussi bien de nos professeurs, en qui nous avons toujours trouvé des conseillers bienveillants et éclairés, que de nos aimables camarades alsaciens qui nous réservèrent un chaleureux accueil et parmi lesquels nous eûmes la joie de découvrir de profondes et solides amitiés.

CHAPITRE PREMIER

Étudiant les produits de décomposition de l'albumine — élément principal et fondamental de tout être vivant et indispensable aliment — M. St. Bondzynski (8) avait toujours été frappé par la simplicité de ces produits, si peu nombreux, tels que l'urée et le glycocolle, qui résultent de la désagrégation des protéines.

Alors que les poids moléculaires de ces produits de décomposition varient entre 60 et 80 et ne contiennent qu'un ou deux atomes de carbone, les corps protéiques qui sont à leur origine possèdent des molécules très complexes, un nombre d'atomes de carbone très élevé (700 environ) et des poids moléculaires très supérieurs (10.000 à 300.000).

D'après Bondzynski la décomposition ne pouvait aboutir uniquement à des éléments simples, mais la désagrégation des albumines devait laisser une part importante d'éléments complexes.

Il entreprit donc des recherches en collaboration avec Gottlieb. Il les effectua sur l'urine de chiens chez lesquels il provoquait une intoxication par le phosphore, qui devait produire des troubles organiques profonds. C'est ainsi qu'il vit apparaître dans l'urine

un nouveau composé qu'il nomma : acide oxyprotéique, soulignant ainsi son rapport avec les corps protéiques. Peu de temps après ce corps fut retrouvé en quantité moindre dans l'urine normale de l'homme.

Poursuivant ses recherches en collaboration avec K. Panek, Bondzynski découvre l'acide alloxyprotéique, et en 1905, avec le concours de K. Panek et St. Dombrowski il voit apparaître un troisième composé qu'il nomme l'acide antoxyprotéique. Pendant ces recherches, Dombrowski isola le principal colorant de l'urine : l'urochrome.

Quels étaient donc ces composés organiques dont les réactions ne correspondaient, sinon de très loin, avec celles des composants déjà connus de l'urine ?

Les ayant soumis à une étude chimique approfondie Bondzynski reconnut des corps très voisins des albumines.

PROPRIÉTÉS ET CONSTITUTION

Si nous nous rapportons à l'avis de St. Bondzynski (8) nous voyons que cet auteur présente ses trois nouveaux produits comme trois acides distincts très voisins des albumines.

a) Ils renferment en effet du soufre et de l'azote facilement détachables ;

Ils possèdent de grandes molécules ;

Ils diffusent difficilement à travers les membranes ;

Ils n'ont pu être obtenus à l'état libre et leurs sels n'ont pu être cristallisés.

b) Ils diffèrent par contre des albumines par leur nature nette d'acides polybasiques et par l'absence de réactions colorées ordinaires de ces albumines.

Ils sont solubles dans l'eau et l'alcool mais insolubles dans l'éther. Ils ne se séparent de leurs solutions concentrées que sous forme de substances sirupeuses. On n'a donc pu les étudier à l'état libre mais seulement à l'état de sels.

En général leurs sels alcalins sont solubles dans l'eau et l'alcool et sont fortement hygroscopiques.

Les autres sels précipitent par l'alcool absolu et par l'azotate d'argent. Tous précipitent par l'acétate de mercure. On discerne pourtant deux groupes de ces corps :

a) L'un précipite par l'acétate basique de plomb : c'est l'acide alloxyprotéique ;

b) L'autre reste en solution en présence de ce réactif : il comprend : l'acide oxyprotéique et l'acide antoxyprotéique.

Ces deux groupes ne diffèrent pas seulement par cette propriété chimique. Les acides oxyprotéique et antoxyprotéique diffusent plus facilement à travers les membranes de parchemin que l'acide alloxyprotéique : l'auteur en conclut que leurs molécules sont de moindres dimensions.

Ces deux derniers acides se distinguent l'un de l'autre dans leur façon de se comporter vis-à-vis de l'acétate de mercure et de l'acide phosphotungstique.

L'acide antoxyprotéique précipite par l'acétate de mercure en solution fortement acétique ; l'acide oxyprotéique au contraire ne précipitera par ce même

réactif qu'après neutralisation de la solution par le carbonate de soude.

Avec l'acide phosphotungstique, l'acide antoxyprotéique précipite en solution concentrée, mais se redissout dans un excès de ce réactif.

De ces trois corps, seul l'antoxyprotéique serait actif sur la lumière polarisée : il serait dextrogyre.

Au point de vue composition de ces trois acides St. Bondzynski nous donne les résultats suivants :

(Étude faite sur les sels de baryum).

Acide oxyprotéique :

C	H	N	S	O
39, 62	5, 64	18, 08	1, 12	35, 54

Acide antoxyprotéique :

43, 21	4, 91	24, 40	0, 61	26, 33

Acide alloxyprotéique :

41, 33	5, 70	13, 55	2, 19	37, 23

Albumine du sérum de cheval :

52, 93	7, 05	15, 89	1, 82	22, 31 %

Par comparaison avec la composition de l'albumine cristallisée du sérum de cheval, on s'aperçoit de l'augmentation en oxygène et la diminution en carbone et hydrogène dans ces composés. Ces trois composés seraient donc avant tout les produits d'oxydation des matières protéiques. Car si nous faisons le rapport du carbone à l'oxygène $\frac{O}{C}$, les résultats sont :

Acide oxyprotéique : 82, 1 %
Acide antoxyprotéique : 60, 9 %

Acide alloxyprotéique : 90 %
Pour l'albumine ce rapport n'est que de : 42, 1 %

Dans les glycoprotéides on trouve également une proportion importante d'oxygène, — teneur en C et en H aussi plus grande — mais cet oxygène provient des glucides qui entrent dans leur constitution. Or les acides oxyprotéiques ne présentent pas la réaction réductrice des sucres sur la liqueur de Fehling ; ils ne peuvent provenir que de l'oxydation des albumines, à laquelle s'associe une désagrégation.

Et Bondzynski nous démontre que cette désagrégation est beaucoup plus poussée chez les acides oxyprotéique et antoxyprotéique que dans l'acide alloxyprotéique, car ce dernier ne contient pas d'azote aminé préformé tandis qu'il est de 38, 8 % dans l'acide oxyprotéique et de 11, 3 % dans l'acide antoxyprotéique.

M. St. Bondzynski se pose encore la question suivante :

Ces trois corps sont-ils des acides proprement dits ?

Comportent-ils des groupes carboxyliques ou seulement des groupements semblables à ceux que nous rencontrons dans l'acide urique ? Ou l'un et l'autre ?

A l'analyse des sels de baryum et d'argent, cet auteur obtient :

24, 5 % de baryum pour l'acide antoxyprotéique.
30, 7 % — — — — oxyprotéique.
35, 4 % — — — — alloxyprotéique.

37, 1 % d'argent pour l'acide antoxyprotéique.
45, 2 % — — — oxyprotéique.
43, 9 % — — — alloxyprotéique.

La proportion élevée de métaux est frappante. Mais il faut remarquer que les sels d'argent renferment plus d'argent que les sels barytiques ne renferment de baryum dont la proportion devrait être respectivement 27, 07 % — 37, 01 % — 42, 4 %.

Il y aurait donc substitution en plus grand nombre, des atomes d'hydrogène pour les sels d'argent que pour les sels de baryum. Ces derniers présentent néanmoins une réaction alcaline.

Et l'auteur prétend conclure d'après ces dernières données, que les deux sortes de groupements se rencontrent dans les acides oxyprotéiques.

De plus, il donne, sous toute réserve, la formule du sel d'argent de l'acide alloxyprotéique qu'il a calculée en supposant qu'il ne renferme qu'un atome de soufre. Elle serait :

$$C^{50}\ H^{72}\ N^{14}\ O^{34}\ S\ Ag^{15}$$

CHAPITRE II

EXTRACTION DES ACIDES OXYPROTÉIQUES

Nous avons suivi la technique décrite par St. Bondzynski, Dombrowski et Panek (1).

Le point difficile à résoudre était l'évaporation de l'urine : on ne pouvait dépasser une certaine température sans amener la décomposition des produits que nous recherchions.

Nous avons d'abord essayé la concentration de l'urine par congélation. Un récipient en verre contenant l'urine était entouré d'un mélange convenable de glace et de sel. Et nous éliminions les cristaux de glace qui se formaient. A cette température nous étions assurés de la conservation de nos produits. Au début de l'opération, les cristaux se présentaient incolores mais à un certain degré de concentration, ils se trouvaient colorés en jaune, donc entraînaient avec eux une forte quantité de corps dissous dans l'urine. Il y avait perte notable de produits.

Nous avons abandonné ce mode opératoire et avons pensé à distiller notre matière première dans le vide.

Un ballon à fond rond d'une contenance de 5 litres

et en verre épais plongeait dans un bain-marie où de l'eau était entretenue à une température convenable (55° ainsi que le recommande M. Giedroyc (7). Ce ballon était relié à un réfrigérant descendant en verre résistant, qui par l'intermédiaire d'une fiole à eau, communiquait avec une trompe à vide.

Dans l'appareil nous introduisions trois à quatre litres d'urine normale et moyenne d'homme, de femme ou d'enfant, après l'avoir légèrement acidulée au moyen de SO^4H^2. En faisant le vide la distillation se produisait assez rapidement. Pour conserver notre urine et éviter les fermentations, nous ajoutions quelques cristaux de thymol.

L'opération était arrêtée lorsque le résidu était arrivé à une consistance sirupeuse, c'est-à-dire lorsqu'il atteignait un volume d'environ 80 à 100 cc.

A l'urine ainsi concentrée nous ajoutions une fois et demi son volume d'alcool à 95°. Il se formait un précipité constitué par des sulfates alcalins et de calcium. Après filtration de la liqueur et des lavages répétés à l'alcool tant que celui-ci ne s'écoulait pas clair, nous ramenions celle-ci à son volume primitif en opérant toujours dans les mêmes conditions de distillation.

A deux reprises, nous la traitions ensuite par un égal volume d'éther dans une ampoule à décantation. Par cette opération on éliminait un ensemble d'acides solubles dans l'éther, tels que : acides butyrique, oxybutyrique, succinique, acétique, hippurique, etc.. Après repos d'une heure ou une heure et demie, lorsque la surface de séparation était nette nous décantions la couche aqueuse de coloration brune. L'éther était légèrement coloré en jaune.

A la solution aqueuse nous ajoutions de l'eau de baryte saturée, et en excès. Il se formait un précipité dans lequel se trouvaient les acides sulfurique, phosphorique et urique. En même temps se constituaient les sels de baryum des acides oxyprotéiques, solubles dans l'eau. Un courant de gaz carbonique éliminait l'excès de baryte, sous forme de carbonate.

Toujours dans le vide et à la température de 55° nous évaporions de nouveau la liqueur filtrée, à consistance de sirop très épais.

Le résidu était agité ensuite avec 120 cc. d'alcool absolu, laissé en contact une heure et renouvelé deux fois, afin de dissoudre la plus grande partie de l'urée, ainsi que le recommande M. Giedroyc (7). Mais en même temps il s'était formé un précipité constitué par les oxyprotéinates de baryum, insolubles dans l'alcool.

Tout ce précipité filtré sur papier et lavé à l'alcool se présentait sous forme de poudre légèrement colorée en jaune. Après dessication, sur le filtre, à douce température (30°) il était dissout dans une petite quantité d'eau et traité par l'acétate basique de plomb, qui précipitait l'acide alloxyprotéique et l'urochrome.

Ce précipité était séparé par filtration sur papier et conservé pour en extraire ultérieurement l'acide alloxyprotéique, tandis que la liqueur était traitée par du carbonate de soude afin d'éliminer le plomb en excès, sous forme de carbonate de plomb insoluble. Nous avons employé une solution saturée de carbonate de soude, en quantité telle que le plomb soit entièrement précipité. C'est à partir de cette solution que nous obtenions les acides antoxyprotéique et oxyprotéique. Acidifiée fortement par l'acide acétique, nous ajoutions

quelques centimètres cubes d'une solution à 20 % d'acétate de mercure. Au bout de quelques heures, le sel mercurique de l'acide antoxyprotéique s'était déposé sous forme de flocons. Ils étaient recueillis sur un filtre.

La partie liquide traitée par du carbonate de soude afin de neutraliser l'acide acétique, laissait déposer à son tour le sel mercurique de l'acide oxyprotéique. Il se présentait à peu près sous la même forme que le sel de l'acide antoxyprotéique.

Quant au précipité provoqué par l'acétate de plomb au cours de nos opérations précédentes, nous lui faisions subir une décomposition fractionnée par l'acide oxalique (solution à 10 %). Après filtration la liqueur était neutralisée par du carbonate de chaux qui, tout en éliminant l'acide oxalique en excès, transformait l'acide alloxyprotéique en son sel de chaux soluble dans l'eau. Avec quelques centimètres cubes de solution à 20 % d'acétate de mercure, il nous était facile d'obtenir le sel de mercure insoluble et de le séparer par filtration sur papier.

Nous possédions alors les sels mercuriques de nos trois acides, que nous traitions successivement par un courant d'H^2S. Nous avons choisi l'H^2S, parce que le mercure précipite facilement par cet acide, et que lui-même se laisse bien éliminer. Le sulfure de mercure s'étant déposé, la liqueur était filtrée, traitée par de l'eau de baryte saturée qui nous donnait les sels de baryum en solution.

Pour obtenir ces sels à l'état sec, il nous a fallu précipiter l'excès de baryte par un courant de gaz carbonique, filtrer, concentrer la solution dans des cristal-

fisoirs au bain-marie jusqu'à consistance sirupeuse très épaisse et précipiter les sels par de l'alcool absolu. Recueillis sur un filtre en papier nous les avons fait sécher à l'étuve à 77° (Giedroyc), ces corps supportant mieux une température aussi élevée lorsqu'ils sont à l'état pulvérulent.

Propriétés et réactions

Les produits d'une telle extraction se présentaient sous la forme suivante :

Les trois sels de baryum étaient des poudres blanches granuleuses très hygroscopiques, très solubles dans l'eau mais insolubles dans l'alcool.

En ce qui concerne les réactions d'identité les différenciant nettement, données par les auteurs Bondzynski et Zoja (9) et auxquelles nous avons soumis successivement nos trois corps, elles étaient les suivantes : une solution de chacun à 1 %, traitée par quelques gouttes d'acétate basique de plomb présentait pour l'acide alloxyprotéique un précipité blanc, et seulement pour celui-ci.

Une solution de même concentration de chaque corps ne donnait un précipité par l'acide phosphotungstique qu'avec l'acide antoxyprotéique.

Quant à l'acide oxyprotéique qui est le seul à présenter une réaction en présence du réactif de Millon (solution de nitrate de mercure dans acide azotique nitreux) il nous a donné une légère coloration chamois.

Une micro-analyse par les méthodes de Pregl, de

nos produits d'extraction (oxyprotéinate et antoxyprotéinate de baryum) nous a donnée les résultats suivants :

Oxyprotéinate : prise d'essai : 4 mg. 455.
CO^2 : 2 mg. 175.
H^2O : 2 mg. 115.
cendres : 1 mg. 842.

La proportion de matières organiques est de 58, 5 % pour 41, 4 % de cendres.

Dans les matières organiques le pourcentage de carbone se trouve être de 23 % et celui d'hydrogène de 12, 5 %, au lieu de 39, 62 % et 5, 64 % signalé par Bondzynski.

Antoxyprotéinate : prise d'essai : 4 mg. 377.
CO^2 : 2 mg. 836.
H^2O : 2 mg. 115.
cendres : 1 mg. 529.

soit 65, 2 % de matières organiques et 34, 8 % de cendres. La proportion de carbone est donc de 27, 2 % et de l'hydrogène 8, 2 %, au lieu de 43, 21 % et 4, 91 % signalés par le même auteur.

Nous sommes donc en présence de corps impurs. Nos produits sont très hygroscopiques. C'est ce qui explique l'augmentation en hydrogène et la diminution du pourcentage de carbone.

De plus Giedroyc (7) a signalé la présence de l'urée à côté des acides oxyprotéiques. Cette urée provient de ce que, incomplètement éliminée par les lavages des sels de baryum par l'alcool, elle forme avec l'acétate de mercure un composé insoluble qui

précipite en même temps que les sels de mercure des acides oxyprotéiques et il est extrèmement difficile à éliminer par changement de solvants et de précipitations.

Nous avons fait l'essai au xanthydrol de Fosse, sur nos produits et nous avons obtenu un précipité de dixanthylurée ; et un dosage par la même méthode nous a permis d'y déceler une proportion de 11 % d'urée. Cependant la constante de dissociation de celle-ci étant infime, ce pourcentage d'urée ne pouvait nous gêner dans nos essais.

Méthode de dosage

Furth (10) nous présente une méthode de dosage de l'azote dans les acides oxyprotéiques. Elle repose sur le principe suivant :

On décompose d'abord l'urée par l'uréase des haricots de Soja, dans une quantité connue d'urine. On transforme ensuite le carbonate d'ammonium formé en sulfate, en ajoutant de l'acide sulfurique à 10 %, et on concentre jusqu'à consistance sirupeuse.

On traite par l'alcool à 95°, on filtre et lave le résidu, et la liqueur alcoolique est concentrée de nouveau.

On ajoute de la baryte en excès ; celui-ci est enlevé par un courant de CO^2. On concentre encore la liqueur filtrée et on traite par l'alcool absolu qui précipite les sels de baryum des acides oxyprotéiques. Ceux-ci sont redissous dans l'eau ; la solution est amenée à

une quantité déterminée et dans une partie aliquote on dose l'azote par la méthode de Kjeldhal.

Pour doser l'azote de l'acide oxyprotéique, on traite alternativement une autre partie aliquote avec une solution d'acétate de mercure à 20 % et une solution de soude caustique à 10 %, jusqu'à ce qu'il y ait un précipité jaune ou rouge. On filtre, lave le précipité et d'après la méthode de Kjeldhal, on dose l'azote.

Le rendement de nos urines en acides oxyprotéiques a été très variable suivant la catégorie employée.

Dans l'urine masculine (urine moyenne d'hommes normaux), le rendement fut de deux à trois grammes de chacun des sels de baryum, pour trois litres d'urine.

L'urine de femme était une urine moyenne, normale, prélevée en dehors des périodes de menstruation. Le rendement fut moindre, surtout en ce qui concerne l'acide antoxyprotéique dont l'échantillon fut insuffisant pour les mesures de pH.

L'urine d'enfant était celle d'un enfant normal âgé de 5 ans.

Dans les chapitres suivants nous allons exposer les mesures physico-chimique que nous avons faites sur les sels des acides oxyprotéiques. Elles porteront sur la tension superficielle de leurs solutions ;

sur les courbes de saturation en fonction du pH ;

sur la cataphorèse ;

et sur le coefficient d'absorption des radiations ultraviolettes par les acides oxyprotéiques.

CHAPITRE III

TENSION SUPERFICIELLE DES SOLUTIONS D'ACIDES OXYPROTÉIQUES

Nous avons fait porter l'étude de la tension superficielle sur des solutions de nos produits à concentration croissante.

Nous avons employé la méthode par arrachement de l'anneau appliquée dans le tensiomètre Lecomte du Nouy. Cet appareil se compose d'un levier portant à l'une de ses extrémités un anneau en platine suspendu par un petit crochet ; il est fixé d'autre part à un fil de torsion. Celui-ci est solidement fixé par l'une de ses extrémités ; par l'autre, il est relié à un index tournant autour d'un cadran indiquant en dynes la force de torsion. Cet index peut être mû soit à la main, soit au moteur. Un dispositif à levier et contrepoids indique le moment précis où, l'anneau soulevé par la force de torsion du fil, n'étant plus retenu par la tension superficielle, est arraché de la surface du liquide.

Ce dernier est contenu dans un petit cristallisoir en quartz, facile à calciner.

Mise au point de l'appareil. — Avec l'eau distillée ; on amène l'index au zéro de la graduation. A ce moment, l'anneau de platine, préalablement calciné, plonge dans la solution. On place le levier à égale distance de deux lignes de repère vues à travers un petit microscope, pour s'assurer qu'il est bien horizontal. Cette manœuvre se fait en abaissant ou en soulevant le cristallisoir placé sur un petit plateau réglable au moyen d'une vis. Le dispositif est prêt pour le premier essai à l'eau distillée.

On fait tourner l'index, soit à la main, soit au moteur, mais très lentement. Au moment où l'anneau est arraché de la surface du liquide, on note :

la graduation lue au vernier, qui donne le nombre de dynes par centimètres carrés ;

la température à laquelle on fait les essais.

Avec les solutions, on procède de la même façon, en ayant bien soin, au préalable de calciner chaque fois l'anneau de platine et le cristallisoir.

Opérant avec des solutions d'oxyprotéinate, d'antoxyprotéinate et d'alloxyprotéinate fraîchement préparées, et dont la concentration était de 3 ‰, 1 ‰ et 0,66 ‰ nous avons obtenu les résultats suivants :

		Dynes/cm²	
Oxyprotéinate.	Temp. 21°5		
Étalonnage.	Eau distillée.....	78,5	conforme au recueil de Constantes Physiques
Solution à	3 ‰.....	65,5	
	1 ‰.....	72,3	
	0, 66 ‰.....	73,8	
Antoxyprotéinate.	Temp. 22°5		
Étalonnage.	Eau distillée.....	78,3	
Solution à	3 ‰.....	61	

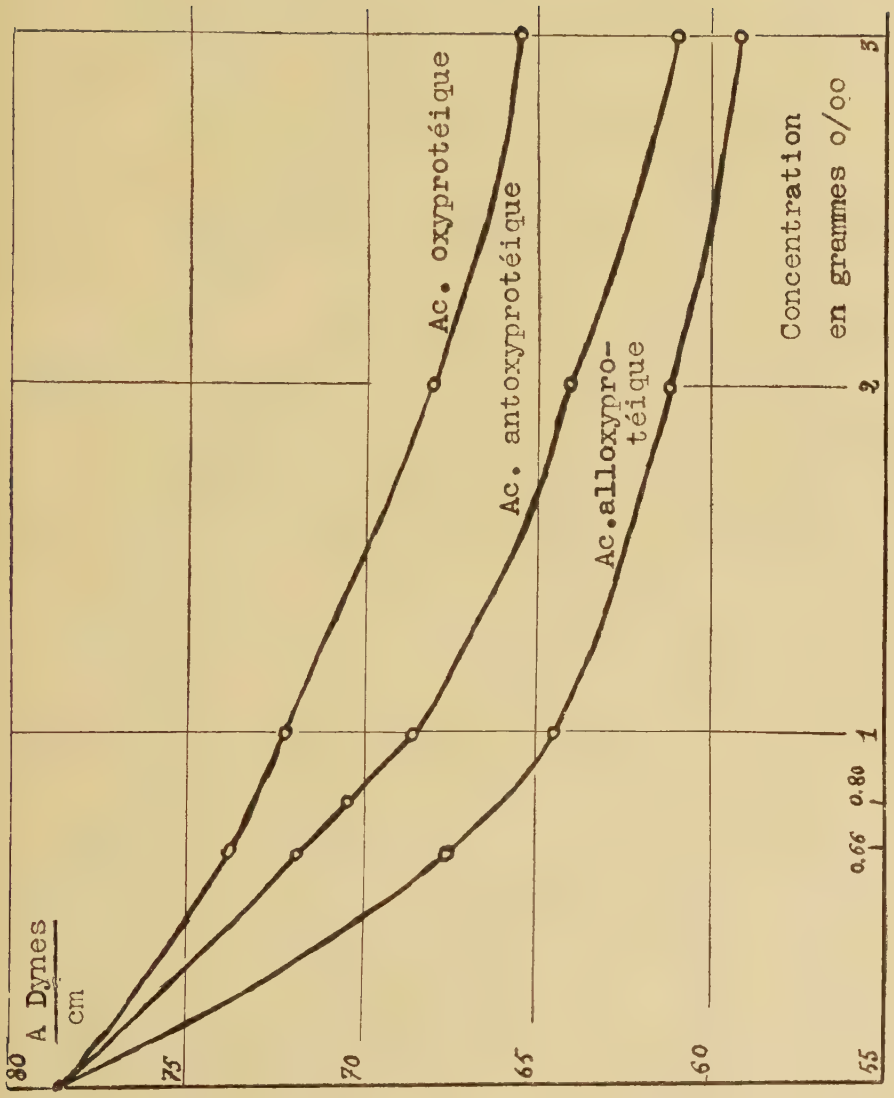
A Dynes
cm
80
75
70
65
60
55
Ac. oxyprotéique
Ac. antoxyprotéique
Ac. alloxyprotéique
Concentration
en grammes o/oo
0.66
0.80
1
2
3

Fig. I.

Solution à 2 ‰	64,2
— 1 ‰	68,5
— 0, 80 ‰	70,3
— 0, 66 ‰	72

Alloxyprotéinate. Temp. 21°5

Étalonnage. Eau distillée	78,5
Solution à 3 ‰	59,2
1 ‰	64,5
— 0, 66 ‰	67,5

Les courbes de la figure I représentent la variation de la tension superficielle des solutions des acides oxyprotéiques en fonction de leurs concentrations. En abscisse nous avons porté la force de la tension superficielle représentée en dynes par centimètre, et en ordonnée, la concentration en grammes pour mille centimètres cubes.

On voit que la tension superficielle tend rapidement vers une limite qui semble atteinte pour des concentrations de l'ordre de 10 ‰.

Il n'y a donc pas d'anomalies en fonction de la concentration.

Le temps nous a manqué pour reprendre sur les acides oxyprotéiques les célèbres expériences que Loeb effectua sur les protéines, démontrant la remarquable anomalie de la tension superficielle au point isoélectrique. Ces expériences auraient apporté une confirmation utile à nos mesures de cataphorèse destinées à rechercher les points isoélectriques de ces substances.

CHAPITRE IV

TRACE DES COURBES DE SATURATION

Nous avons tracé les courbes de saturation de nos produits au moyen de l'électrode à antimoine et du potentiomètre Chauvin et Arnoux.

Cette électrode, étudiée et décrite par M. Vles et Mlle Gex (13), est constituée par deux piles. Chacune est au calomel et comporte un élément avec solution électrolytique : dans l'élément de la première pile, cette solution est constituée par de l'acide chlorhydrique $\frac{N}{10}$ de pH connu ; dans l'élément de la deuxième pile nous avons une solution de pH inconnu. Dans chacun plonge une électrode à antimoine, reliée par un fil de cuivre. Les électrodes en platine, des deux piles, sont reliées au potentiomètre. La pile à HCl $\frac{N}{10}$ est reliée au pôle négatif, l'autre au pôle positif.

Le potentiomètre nous donne la force électromotrice en millivolts. La différence des forces électromotrices correspond à une différence de pH des deux solutions.

L'étalonnage de cette électrode à antimoine se fait au moyen de l'électrode à hydrogène, du type Vles-Vellinger, en établissant une gamme de solutions tampons grâce auxquelles on construit une droite d'étalonnage des cellules montées en opposition. Cette droite doit être établie pour chaque série de mesures, afin d'éliminer les causes d'erreur qui proviennent des changements d'état accidentels, dans les contacts antimoine-solution.

Pour le fonctionnement et la manipulation de l'appareil nous avons suivi la technique et les conseils donnés par M. Vles dans son *Traité de Chimie physique* (13) et la thèse de Mlle Y. Matthis (14), *Etude électrométrique des protéines de la farine.*

Pour construire les courbes de saturation, nous avons utilisé comme réactif une solution de NaOH $\frac{N}{10}$ que nous avons ajoutée par 0 cm³, 50 ou par 0 cm³, 25 au voisinage des points d'inflexion.

Après chaque addition de réactif nous faisions la mesure du pH, en lisant sur le potentiomètre la force électromotrice et en reportant celle-ci sur la droite d'étalonnage qui nous donnait le pH de la solution.

Au moyen de ces points, en portant en abscisse les valeurs de pH, et en ordonnée les quantités de réactif ajoutées nous avons obtenu des courbes de saturation.

Mais, dans ces courbes, les points d'inflexion sont souvent difficiles à lire. Selon les circonstances, on constate qu'il faut quelquefois des quantités minimes de réactif pour produire une forte variation de pH ; dans d'autres cas, de grandes quantités de réactif ne font pas varier le pH dans des proportions appréciables.

Cette résistance à la variation du pH s'appelle le coefficient tampon, qui est représenté par la formule :

$$\tau = \frac{\Delta m}{\Delta pH}$$

Δm = la quantité de réactif ajoutée pour produire la variation ΔpH du pH.

On construit alors la courbe coefficient tampon qui représente la pente de la courbe de neutralisation.

On porte en ordonnée ΔpH et en abscisse le pH moyen compris entre deux extrémités de la variation ΔpH.

Sur la courbe de saturation, les points d'inflexion caractéristiques des demi-saturations des fonctions acides (pK) sont transformés dans la courbe des coefficients tampons en maxima très aigus, qui permettent de repérer les pK avec beaucoup plus de sensibilité qu'on ne pourrait le faire sur les courbes de saturation où les faibles inflexions peuvent passer inaperçues.

On calcule ensuite le point isoélectrique par le moyen des pK.

A chaque fonction acide ou basique correspond un pK déterminé ; dans la courbe de saturation il se manifestera par un point d'inflexion. A ce moment il y a, en solution, autant de fonctions ionisées que de fonctions saturées du même type.

Un certain nombre de fonctions acides du même type, c'est-à-dire du même pK, de toutes les molécules peuvent être saturées de façon à équilibrer les fonctions basiques libres : le corps passe en un *point isoélectrique*. Ces points isoélectriques, ainsi déterminés ne sont que

des points *apparents* alors que la cataphorèse nous donne des points isoélectriques *vrais*.

Si on observe sur la courbe coefficient tampon un minimum pK_1 et un autre minimum pK_2 nous aurons :

$$\text{point isoél.} = \frac{pK_1 + pK_2}{2}$$

Pour chacun de nos produits nous avons donc construit :

1° La courbe de saturation ;

2° La courbe coefficient tampon.

Nous avons opéré sur des solutions de sels de baryum des acides oxyprotéiques dont la concentration était de 0,10 %. Ces solutions devaient être employées à l'état frais afin d'éviter les erreurs se produisant avec des solutions vieilles seulement de 24 heures, et dont les courbes de saturation présentaient une notable différence.

25 cc. de la solution à 0,10 % étaient prélevés, et, sur cette prise d'essai, nous faisions la titration électrométrique au moyen de NaOH $\frac{N}{10}$ et de HCl $\frac{N}{10}$.

Oxyprotéinate de Ba masculin.

E	PH	Δ pH	pH moyen
580	12,40		
577	12,38	2	12,39
575	12,30	8	12,34
565	12,10	20	12,20
556	11,92	18	12,01
549	11,80	12	11,86
536	11,54	26	11,76

E	PH	Δ pH	pH moyen
509	11,04	50	11,29
292	6,92	412	8,98
133	3,90	302	5,41
48	2,25	65	3,07
27	1,86	39	2,05
14,5	1,60	16	1,73
7,5	1,26	34	1,43

Voir courbe de saturation homme, graphique (fig. II) et courbe de coefficient tampon (fig. III).

Les minima que nous trouvons dans cette courbe et représentant les pK sont :

$$pK_1 = 1{,}73$$
$$pK_2 = 11{,}86$$

Calculons le point isoélectrique par la formule :

$$\frac{pK_1 + pK_2}{2}$$

nous obtenons :

$$\frac{1{,}73 + 11{,}86}{2} = \text{point isoél.} = 6{,}80$$

Oxyprotéinate de Ba féminin :

E	pH	Δ pH	pH moyen
564	12,04		
561	11,96	8	12
558	11,88	8	11,97
550	11,76	12	11,82
545	11,66	10	11,71
543	11,60	6	11,63
540	11,56	4	11,58

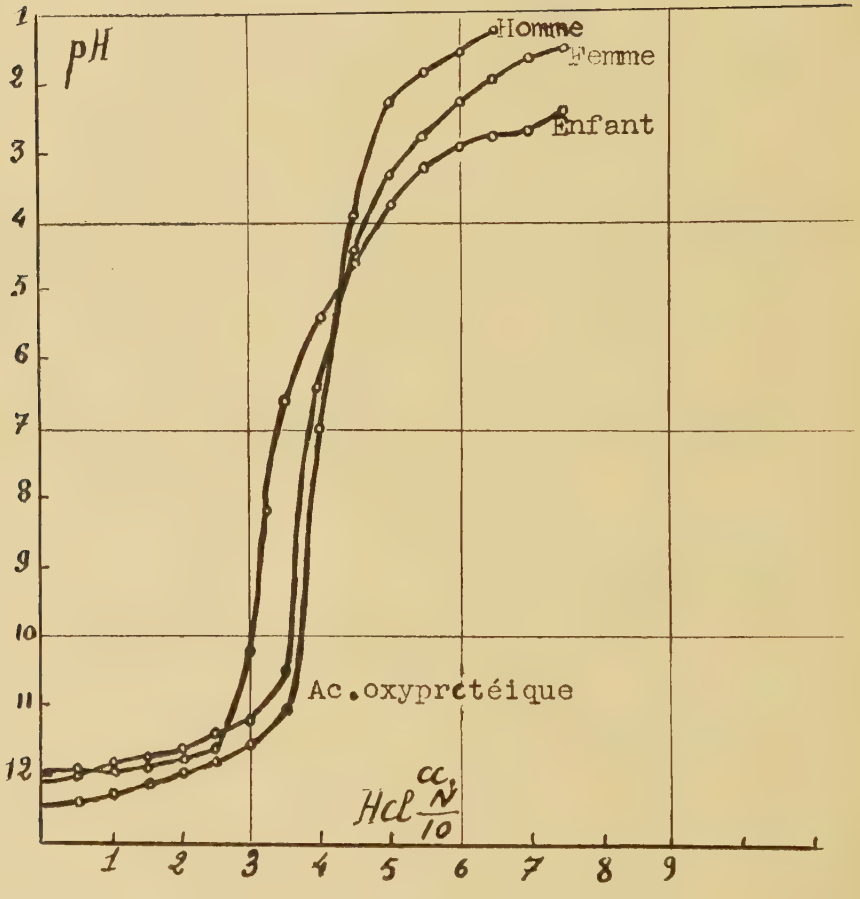
pH
Homme
Femme
Enfant
Ac.oxyprotéique
HCl cc. N/10
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

Fig. 11.

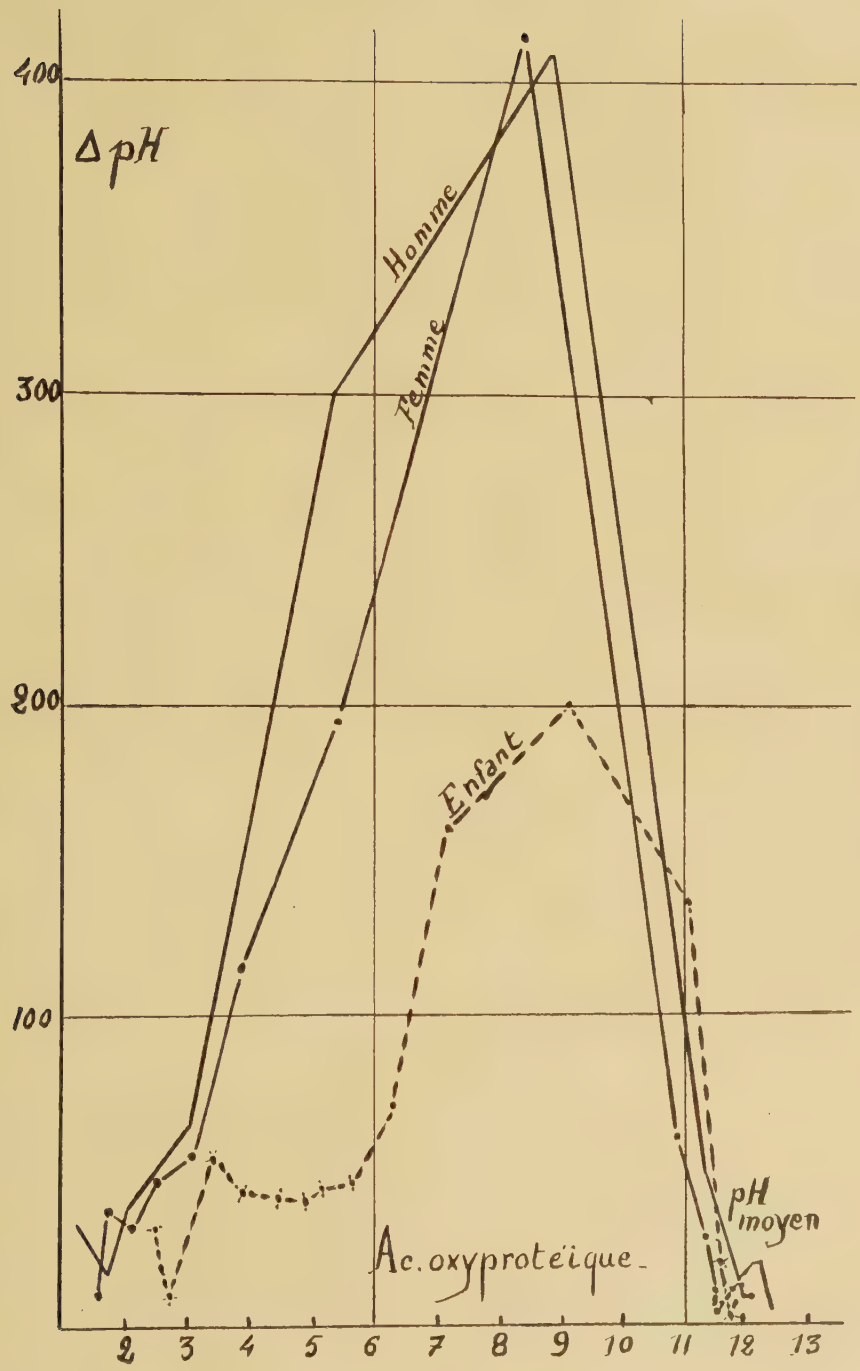
400
ΔpH
300
200
100
Homme
Femme
Enfant
pH moyen
Ac. oxyproteïque.
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13

Fig. 111.

E	pH	Δ pH	pH moyen
535	11,48	8	11,52
520	11,20	28	11,34
487	10,60	60	10,90
265	6,40	420	8,50
162	4,48	196	5,42
102	3,32	116	3,90
82	2,78	54	3,05
58	2,30	48	2,54
38	1,98	32	2,14
20	1,60	38	1,79
15	1,52	8	1,56

Voir courbe de saturation femme, graphique (fig. II). et courbe de coefficient tampon (fig. III).

Nous trouvons les pK suivants :

$$pK_1 = 2,14$$
$$pK_2 = 11,58$$

Le point isoélectrique est : 6,86.

Oxyprotéinate de Ba d'enfant :

E	pH	Δ pH	pH moyen
552	11,96		
548	11,90	6	11,93
546	11,88	2	11,89
544	11,75	4	11,86
532	11,60	15	11,67
462	10,20	140	10,90
358	8,20	200	9,20
274	6,60	160	7,40
237	5,90	70	6,25

E	pH	Δ pH	pH moyen
218	5,44	46	5,67
190	5	44	5,22
170	4,60	40	4,82
158	4,18	42	4,39
124	3,74	44	3,96
95	3,20	54	3,47
75	2,92	28	3,06
73	2,78	14	2,85
68	2,74	8	2,76
54	2,42	32	2,58

Voir courbe de saturation enfant, graphique (fig. II) et courbe de coefficient tampon (fig. III).

$$pK_1 = 2,76$$
$$pK_2 = 11,89$$

Point isoélectrique : 7,32.

Antoxyprotéinate de Ba masculin :

E	pH	Δ pH	pH moyen
499	10,78		
496	10,68	10	10,73
494	10,64	4	10,66
490	10,58	6	10,61
485	10,48	10	10,53
480	10,40	8	10,44
466	10,12	28	10,26
441	9,64	48	9,88
434	9,5	14	9,57
430	9,4	10	9,45
419	9,2	20	9,30

E	pH	Δ pH	pH moyen
211	5,43	377	7,31
103	3,48	195	4,45
77	2,98	50	3,23
64	2,72	26	2,85
57	2,60	12	2,66
52	2,52	8	2,56
48	2,42	10	2,47
44	2,36	6	2,39
41	2,28	8	2,32
36	2,20	8	2,24
32	2,12	8	2,16
29	2,06	6	2,09
25	2	6	2,03

Voir courbe de saturation, homme, graphique (fig. IV) et courbe coefficient tampon (fig. V).

$$pK_1 = 2{,}56$$
$$pK_2 = 9{,}45$$
$$pK_3 = 10{,}66$$

Points isoélectriques :

$$\frac{2{,}56 + 9{,}45}{2} = 6$$

$$\frac{9{,}45 + 10{,}66}{2} = 10$$

Nous n'avons pu faire la courbe de saturation de l'antoxyprotéinate féminin, n'ayant pu extraire la quantité suffisante de produit (la précipitation par l'acétate de mercure n'ayant pas donné de résultat).

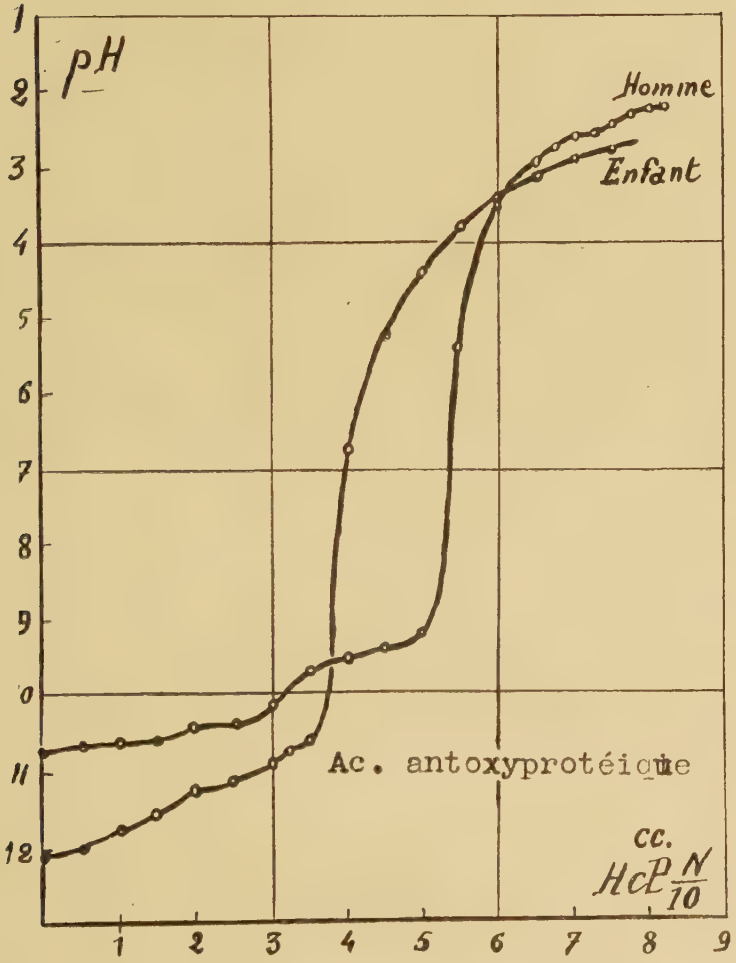
pH
Homme
Enfant
Ac. antoxyprotéique
cc.
HCl N/10
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

Fig. IV.

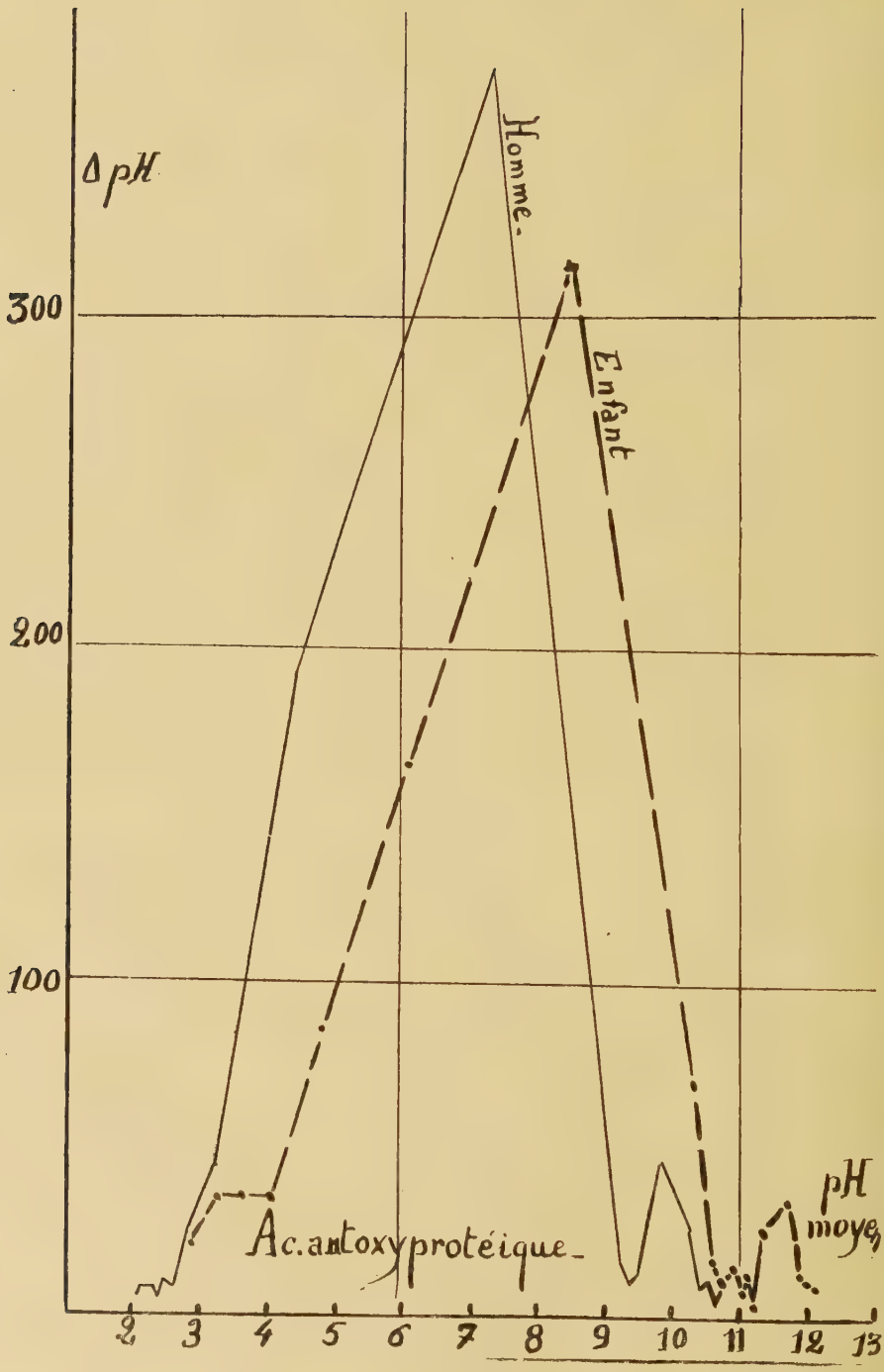
Δ pH
300
200
100
Homme.
Enfant
Ac. antoxyprotéique.
pH moyen
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13

Fig. V.

Antoxyprotéinate de Ba de l'enfant :

E	pH	Δ pH	pH moyen
550	12,10		
544	12	10	12,05
538	11,88	12	11,94
522	11,52	36	11,70
509	11,26	26	11,39
506	11,24	2	11,25
498	11,10	14	11,17
495	11,04	6	11,07
485	10,88	16	10,96
480	10,76	12	10,82
476	10,68	8	10,72
440	10	68	10,34
275	6,84	316	8,42
190	5,20	164	6,02
147	4,35	85	4,77
127	3,80	35	4,07
100	3,44	36	3,62
81	3,08	36	3,26
69	2,84	24	2,96

Voir courbe de saturation, enfant, graphique (fig. IV) et courbe coefficient tampon (fig. V).

Les pK trouvés sont :

$$pK_1 = 2,96$$
$$pK_2 = 10,72$$
$$pK_3 = 11,25$$

Les points isoélectriques sont donc :

6,84
et 10,98

Alloxyprotéinate de Ba masculin :

E	pH	Δ pH	pH moyen
571	12,50		
568	12,48	2	12,49
565	12,40	8	12,44
561	12,36	4	12,38
559	12,30	6	12,33
555	12,20	10	12,25
553	12,18	2	12,19
552	12,16	2	12,17
549	12,10	6	12,13
544	12	10	12,05
528	11,72	28	11,86
508	11,34	38	11,53
476	10,72	62	11,03
423	9,70	102	10,21
395	9,16	54	9,43
362	8,52	64	8,84
210	5,71	281	7,11
103	3,40	231	4,55
58	2,52	88	2,96
39	2,16	36	2,34
29	1,98	18	2,07
22	1,84	14	1,91
15	1,66	18	1,75
11	1,62	4	1,64

Voir courbe de saturation, homme, graphique (fig. VI) et courbe coefficient tampon (fig. VII).

Les pK trouvés sont :

$$pK_1 = 1{,}91$$

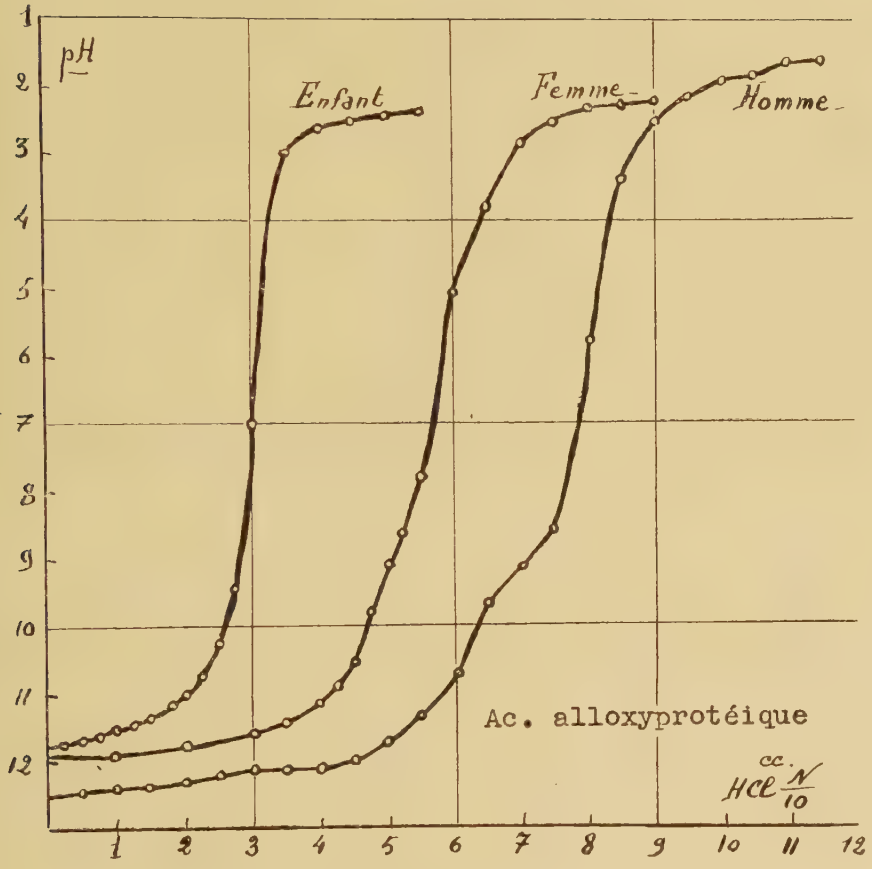
pH
Enfant
Femme
Homme
Ac. alloxyprotéique
cc. N/10 HCl
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

Fig. VI.

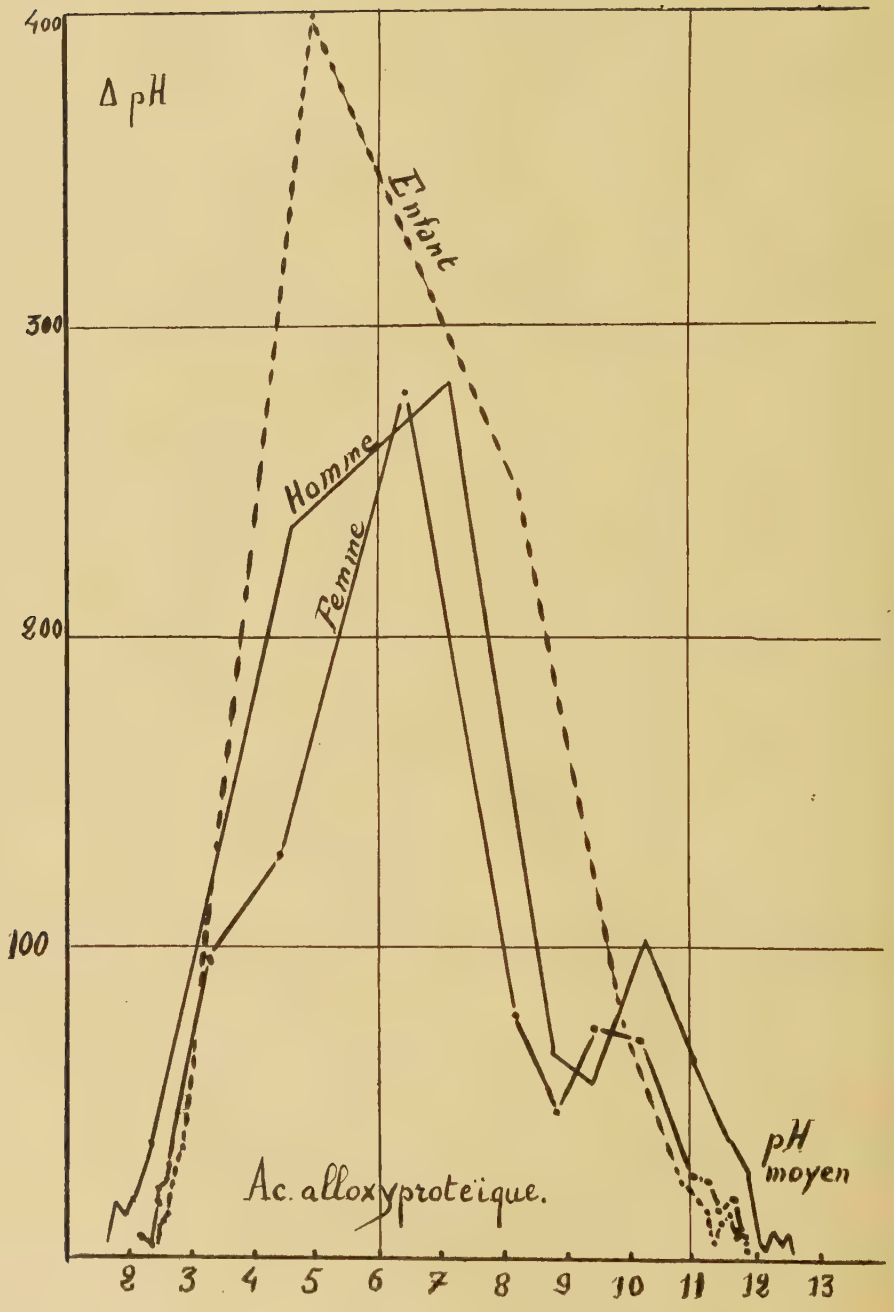
400
Δ pH
Enfant
300
Homme
Femme
200
100
Ac. alloxyproteïque.
pH moyen
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13

Fig. VII.

$pK_2 = 9,43$
$pK_3 = 12,18$

Points isoélectriques :

5,67
et 10,80

Alloxyprotéinate de Ba féminin :

E	pH	Δ pH	pH moyen
557	11,88		
554	11,84	4	11,86
550	11,76	8	11,80
539	11,56	20	11,66
531	11,40	16	11,48
519	11,16	24	11,28
505	10,90	26	11,03
483	10,50	40	10,70
446	9,80	70	10,15
410	9,06	74	9,43
381	8,60	46	8,83
341	7,84	76	8,22
192	5,04	280	6,44
105	3,76	128	4,40
62	2,82	94	3,29
56	2,52	30	2,67
51	2,34	18	2,43
49	2,30	4	2,32
40	2,25	5	2,27

Voir courbe de saturation, femme, graphique (fig. VI) et courbe coefficient tampon (fig. VII).

Les pK sont :

$pK_1 = 2,32$
$pK_2 = 8,83$
$pK_3 = 11,48$

Les points isoélectriques sont donc :

5,57
et 10,15

Alloxyprotéinate de Ba de l'enfant :

E	pH	Δ pH	pH moyen
550	11,76		
545	11,68	8	11,72
536	11,52	16	11,60
532	11,40	12	11,46
528	11,36	4	11,38
520	11,20	16	11,28
511	11	20	11,10
498	10,76	24	10,88
472	10,24	52	10,50
434	9,46	78	9,85
303	7	246	8,23
95	3	400	5
75	2,64	36	2,82
68	2,52	12	2,58
65	2,44	8	2,48
64	2,40	4	2,46

Voir courbe de saturation, enfant, graphique (fig. VI) et courbe coefficient tampon (fig. VII).

Nous trouvons les pK suivants :

$pK_1 = 2,46$

$pK_2 = 11{,}38$
$pK_3 = 11{,}72$

Nous avons donc les points isoélectriques :

6,92
et 11,55

Au cours des opérations de saturation, nous n'avons observé pour les différentes solutions, aucun phénomène de précipitation, floculation ou changement de couleur.

Étude des courbes

L'analyse des courbes de saturation, et surtout des courbes de coefficient tampon démontre l'analogie de forme entre les acides oxyprotéique, alloxyprotéique et antoxyprotéique chez l'homme, la femme et l'enfant. Cependant on peut observer des différences entre les points isoélectriques et les pK trouvés.

Fallait-il considérer ces différences comme réelles ou apparentes ?

Avec le même corps et dans les mêmes conditions nous avons fait deux fois la courbe de saturation. Nous avons trouvé chaque fois des pK légèrement différents, mais avec le même écart entre les produits provenant de l'urine de l'homme, de la femme et de l'enfant.

Nous constatons donc de légères différences de nature entre les mêmes acides de provenance diverse. Pour une urine moyenne chez l'homme et la femme nous obtenons des résultats assez analogues. Mais chez

l'enfant les courbes sont un peu différentes, les variations sont moins accusées, et le tracé en est plus régulièrement arrondi. Le métabolisme des albuminoïdes semblerait donc ne pas être le même chez les adultes et chez les enfants en période de croissance.

De plus nous sommes frappés par la façon dont sont placés les pK apparents et les points isoélectriques.

Pour les trois acides les pK sont groupés de manière à peu près analogue ; chacun comporte un pK aux environs de pH 2 ou pH 3 et un autre pK dans le voisinage de pH 12 en ce qui concerne l'acide oxyprotéique et l'acide alloxyprotéique. Ce deuxième pK se trouve reporté vers pH 11 dans l'acide antoxyprotéique.

Mais nous remarquons l'apparition d'un troisième pK dans les acides antoxyprotéique et alloxyprotéique ; il se trouve placé aux environs de pH 10 dans l'acide antoxyprotéique et reporté vers pH 9 dans les acides alloxyprotéiques de l'homme et de la femme et vers pH 11,3 dans le même acide de l'enfant.

En général les pK des acides oxyprotéiques de l'enfant semblent se trouver déplacés vers des pH plus élevés que pour l'homme et la femme, exception faite pour le pK_3 de l'acide alloxyprotéique, dont le plus élevé dans l'échelle des pH, est le pK_3 masculin = 12,18.

CHAPITRE V

CATAPHORÈSE

Principe (13). — Si dans une solution électrolytique contenant en suspension une poudre légère, on établit un champ électrique, on constate que les grains de cette poudre, prenant une charge électrique en absorbant des ions, vont venir s'accumuler à un pôle mais sans s'accoler les uns aux autres, étant chargés identiquement : du fait de la répulsion électrostatique.

Introduisons dans la solution un électrolyte fournissant des ions de signe contraire : on neutralise les charges portées par ces particules.

Soit des ions OH chargés négativement ; si on introduit un acide, les ions H neutralisent la charge négative, d'où destruction de la répulsion électrostatique entre les particules : elles viennent s'accoller les unes aux autres.

En continuant à neutraliser les charges, il arrive un moment où elles sont annulées. Les particules ne se déplacent alors ni dans un sens, ni dans l'autre. Elles présentent l'état isoélectrique.

Continuant à ajouter des ions H, ces mêmes particules se chargent en sens inverse et vont venir s'accumuler à l'autre pôle. Ce phénomène de déplacement des particules dans le champ électrique est nommé la cataphorèse.

Les substances protéiques sont des substances *ampholytes*, c'est-à-dire qu'elles comprennent des fonctions acides et des fonctions basiques, dont le comportement varie avec le pH. Elles peuvent se ramener, d'après la théorie de Loeb aux lois ordinaires des combinaisons d'électrolytes, et en particulier aux règles chimiques des proportions définies, à condition de fixer une variable en supplément qui est la concentration en ions H +.

A pH constant un protéique se comporte comme un corps chimique défini et se combine aux autres ions comme un ion ordinaire de cristalloïde.

Exemples d'ampholytes :

le glycocolle $NH^2 — CH^2 — COOH$
la tyrosine NH^2 et COOH

Dans les pH élevés, les substances protéiques se comportent comme un acide libre. L'ion OH est bloqué par la formation d'un protéinate métallique, lui-même dissocié.

Ex. $OH — NH^3 — R\ COONa \longrightarrow$
$(OH\ NH^3\ R\ COO)^- \quad + \quad Na^+$

Dans les pH bas, la fonction acide est bloquée : les substances protéiques se comportent comme une base ; nous avons un sel de protide :

$Cl^- (NH^3 — R — COOH)^+$

Entre les deux cas se place le point isoélectrique, dans lequel, les charges positives provenant des ionisations basiques et les charges négatives provenant des ionisations acides, sont égales et communiquent à la molécule une charge électrique nulle.

$(OH — NH^3 — R\ COOH)$ ou $+ (NH^3 — R\ COO) —$

L'intérêt technique de ce phénomène est que, du fait de la non-combinaison de la substance protéique avec des ions étrangers, au point isoélectrique, on peut purifier cette substance et la débarrasser des impuretés salines.

En outre la cataphorèse est un moyen de déceler le point isoélectrique par transport électrique d'une substance dans des milieux de pH différents ; elle permet de reconnaître les points isoélectriques vrais (à charge nulle) des points pour lesquels la molécule est sans charge par fixation d'ions. Elle permet donc de faire un choix parmi les points isoélectriques apparents donnés par la courbe de saturation.

Mode opératoire

Nous avons employé, pour nos mesures, le dispositif en série de six tubes en U de MM. Vles et de Coulon, et suivi la technique de ces mêmes auteurs (19 et 20).

Chaque tube en forme de U (fig. VIII), se termine à ses deux extrémités par une ampoule laboratoire A ; à la suite de chacune se trouve un robinet R. Sur ces ampoules, viennent se fixer au moyen de bouchons en caoutchouc, des siphons S reliés deux à deux par

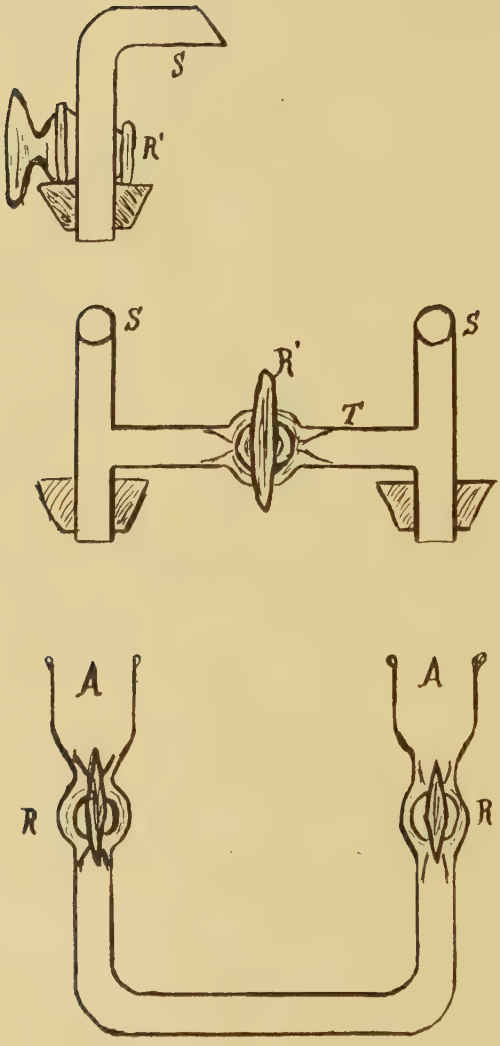

Fig. VIII

un tube de liaison T servant à établir l'équilibre hydrostatique et sur ce même tube un troisième robinet R' sert à isoler chaque siphon.

Le tube entier est placé horizontalement, reposant d'un côté sur un petit support en bois, de l'autre sur ses siphons plongeant dans des petits godets contenant une solution de chlorure de sodium à 9 ‰ et servant de liaison entre deux tubes consécutifs.

Le premier siphon d'entrée et le dernier siphon de sortie du courant plongent chacun dans un petit godet contenant une solution de NaCl à 9 ‰ relié à d'autres godets garnis d'une solution saturée de sulfate de cuivre, par un petit tube en forme de pont, obturé par un tampon de coton imbibé de solution physiologique.

L'arrivée du courant se fait par un contact cuivre-sulfate de cuivre.

L'opération de mesure par cataphorèse se divise en plusieurs temps :

1° Préparation des solutions de NaCl à 9 ‰ à différents pH ;

2° Préparation de nos solutions de produits à différents pH ;

3° Remplissage et manipulation des godets et des tubes ;

4° Marche de la cataphorèse.

1° *Préparations des solutions de NaCl à 9 ‰.* — L'étalonnage se fait au moyen de l'électrode d'antimoine.

On commence par tracer la droite de référence grâce aux solutions tampons.

On prend ensuite 100 cc. environ de la solution NaCl à 9 ‰ qui sont versés dans l'entonnoir de l'appareil et on ajuste au pH voulu au moyen des solutions $\frac{N}{10}$ et $\frac{N}{100}$ de soude ou d'acide chlorhydrique. Quand on a obtenu le pH voulu, on peut soutirer la solution, soit par le robinet après avoir bien nettoyé le tube d'écoulement, soit au moyen d'une pipette, et on la recueille dans une bouteille très propre, sèche et convenablement étiquetée.

On recommence de même pour chaque pH.

2° *Préparation des solutions de corps à transporter.* — On opère de la même façon que pour les solutions physiologiques de NaCl à 9 ‰, mais sur une quantité moindre (10 à 15 cc. seulement) de solution d'acides oxyprotéique, antoxyprotéique ou alloxyprotéique à 1 %. Chaque solution est ensuite recueillie dans un flacon propre et bouchant bien.

Cette dernière manipulation doit avoir lieu au moment de remplir les tubes, afin d'opérer sur des solutions très fraîches et n'ayant subi aucune altération.

3° *Remplissage et manipulation des godets.* — On remplit aux deux tiers chaque godet de liaison avec la solution de NaCl à 9 ‰. Seuls les godets des extrémités sont pourvus de solution saturée de SO^4Cu ; et on relie le premier et le dernier godet à NaCl avec un godet à SO^4Cu, par un petit siphon rempli de solution physiologique et obturé d'un tampon de coton.

Remplissage des tubes. — On sépare les siphons des tubes et on rince le tout avec de la solution physiolo-

gique de même pH que celui avec lequel on veut travailler. Et on place deux petits tampons de coton à l'orifice du siphon communiquant avec l'ampoule.

Tenant verticalement le tube en U, on ouvre les deux robinets et on introduit la solution de la substance à transporter qui a été ajustée au pH déterminé (soit pH 4) jusqu'aux conduits des robinets compris ; on chasse soigneusement toutes les bulles d'air qui gêneraient le passage du courant et après refroidissement de tout le tube sous un filet d'eau, on ferme les deux robinets.

Les deux ampoules sont rincées avec de la solution physiologique NaCl de pH 4 ; on les vide d'un coup sec. Avec cette même solution de NaCl on les remplit de façon à obtenir un ménisque convexe.

Les siphons humectés de solution physiologique et déjà obturés de deux petits tampons de coton, sont ajustés délicatement sur les ampoules en évitant les bulles d'air.

Le tube est alors tenu à plat dans la main ; on ouvre le robinet R' et au moyen d'une pipette très effilée on introduit de la solution physiologique de pH 4 dans les siphons en évitant les bulles d'air dans le tube de liaison. Celles-ci étant chassées en inclinant le tube à droite ou à gauche, on ferme le robinet et on termine le remplissage des siphons à la pipette, qui ne devra plus servir pour les autres solutions.

Le tube est ensuite retourné avec précaution sur les godets de liaison.

On recommence les mêmes opérations pour chaque tube, avec les solutions de pH suivants et en ayant bien soin de pas confondre les différentes solutions.

Le siphon pôle — du tube 1 plonge dans le même godet que le siphon pôle + du tube 2, dont le siphon pôle — à son tour, communique par le godet avec le siphon pôle + du tube 3 et ainsi de suite pour la série.

4° *Cataphorèse.* — Les six tubes étant bien en place, on ouvre avec précaution les robinets de liaison R' des siphons afin d'établir l'équilibre hydrostatique dans les godets. On attend vingt minutes environ et, toujours délicatement, on referme ces robinets.

On ouvre alors les robinets R des tubes en U.

On établit le courant électrique après avoir vérifié aux bornes, la différence de potentiel. Nous avons employé une batterie d'accumulateurs nous fournissant 180 volts soit 30 volts par tube.

On vérifie de même la différence de potentiel à chaque tube et si pour l'un d'eux on constate une différence trop élevée, il faut chercher les bulles d'air dans les robinets, enlever le tube et le rectifier.

La résistance d'un tube doit être de trois milliampères environ, mesurés au milliampèremètre disposé en série.

Nous avons laissé passer le courant pendant deux heures.

Ce temps écoulé, nous avons fermé tous les robinets et coupé le courant.

Après avoir enlevé le premier tube, nous avons détaché les siphons et dans des tubes à essai étiquetés d'avance et portant les signes correspondant aux ampoules (pôle + et pôle —), nous avons recueilli le liquide.

Cette opération fut renouvelée pour chaque tube.

Lecture de la cataphorèse

Nous avons employé l'acétate de mercure comme réactif de précipitation dans les solutions résultant de la cataphorèse.

Nous avons fait quelques essais sur des solutions d'acides oxyprotéiques à concentrations croissantes, nous permettant de nous rendre compte de la sensibilité de ce réactif. Une solution à 20 % d'acétate de mercure nous révélait par quelques gouttes la présence nette de ces acides, dans des solutions à 1 % (concentration employée pour la cataphorèse). Pour chacun des acides n'intervenait qu'une question de milieu.

Pour l'acide oxyprotéique nous avons dû opérer en milieu alcalin. L'acide antoxyprotéique ne précipitait, au contraire, qu'en milieu fortement acétique.

Quant à l'acide alloxyprotéique il précipite dans le milieu ordinaire de la solution.

A chaque tube nous avons ajouté une dizaine de gouttes d'une solution à 20 % d'acétate de mercure. Les précipités se présentaient, après repos d'une heure, sous forme de flocons jaunes tombant au fond du tube. En tournant le tube entre les doigts, ils se dispersaient facilement dans le liquide.

Nous avons obtenu les résultats que nous exprimons dans les tableaux suivants par le schéma : P+ :+ ; ce qui signifie transport au pôle positif ; et P — : +, transport au pôle négatif.

Acide oxyprotéique d'homme. Solution à 1 %.

	pH4	pH5	pH5,5	pH6	pH6,5	pH7	pH9	pH10
P +	+	+	+	o	?	o	o	o
P —	o	?	o	+	+	+	?	+

renversement du signe

	pH11	pH11,5	pH12	pH12,5
P +	+	+	+	o
P —	+	o	o	+

Acide antoxyprotéique de l'homme. Solution à 1 %.

	pH8	pH9	pH9,5	pH10	pH10,5	pH11	
P +	o	+	+	+	+	+	louche
P —	+	o	+	o	o	+	floculat

renversements du signe

Acide alloxyprotéique de l'homme. Solution à 1 %.

	pH7	pH8	pH8,5	pH9	pH10	pH11
P +	o	o	o	o	+	+
P —	+	+	o	+	o	+

renversements du signe

Nous allons comparer ces tableaux de cataphorèse aux résultats tirés des courbes de saturation. Voici dans le tableau suivant les points isoélectriques tirés de ces courbes.

Points isoélectriques apparents :

Acide oxyprotéique	Homme	6,80
	Femme	6,86
	Enfant	7,32
Acide antoxyprotéique	Homme	6 et 10
	Femme	.....
	Enfant	6,84 et 10,98

Acide alloxyprotéique	Homme	5,67 et 10,80
	Femme	5,57 et 10,15
	Enfant	6,92 et 11,55

L'étude de la cataphorèse nous permet de reconnaître deux régions différentes dans l'échelle des pH.

Le tableau de cataphorèse de l'acide oxyprotéique montre, de pH 6 à pH 7, le renversement du déplacement. Avant pH 6,5 l'acide se porte au pôle positif : il est donc chargé négativement, ce qui est bien le fait d'un radical acide ionisé : R^- H^+. L'approche du pH 7 produit la diminution de l'ionisation acide et l'augmentation de l'ionisation basique ; donc il s'agit bien du passage au point isoélectrique.

Nous arrivons donc à cette conclusion, que les points isoélectriques vrais des acides oxyprotéiques sont voisins de pH 7. Selon la nature de l'acide (oxy. alloxy. ou antoxy.) et son origine, il varie de 6,0 à 7,32. Ceci est bien d'accord avec les points isoélectriques des protéines ordinaires.

Une autre région de pH est intéressante, en ce sens qu'il apparaît alors une remarquable instabilité de la molécule. Examinons en effet le tableau de cataphorèse de l'acide oxyprotéique au-delà de pH 10. On observe à pH 11 un déplacement simultané aux deux pôles ; puis vers 11,5 et 12,5 deux renversements du signe de déplacement. Ceci décèle une modification importante dans la structure de la molécule. Sans doute les courbes du coefficient tampon de l'acide oxyprotéique (homme et femme) laisseraient-elles soupçonner l'existence du point isoélectrique voisin de pH 12, mais l'existence d'un état désordonné dans l'équilibre de la molécule

est révélé nettement par le tableau de la cataphorèse.

Nous avons répété les mesures pour les acides antoxyprotéiques et alloxyprotéiques dans cette région du pH et nous avons également observé des zones de perturbation de la molécule de l'acide antoxyprotéique à pH 11 (louche et floculation).

L'acide alloxyprotéique présenterait également un point isoélectrique voisin de 10 (10,8 par la courbe de saturation) et un état instable à partir de pH 11.

Nous arrivons donc aux conclusions suivantes : Les acides oxy. alloxy. et antoxyprotéique présentent des points *isoélectriques vrais* compris entre 6 et 7,5.

La zone de neutralisation de la molécule se trouve à des pH compris entre 10 et 11. Au delà de pH 11 existe une zone d'instabilité moléculaire avec possibilités de dégradation dans la molécule.

Remarquons que l'extraction se fait par l'emploi de l'acide acétique, l'acétate de mercure, peu ionisés, mais aussi par l'acétate basique de plomb, le carbonate de soude, l'eau de baryte, tous, réactifs fortement alcalins.

L'étude physico-chimique que nous avons entreprise nous laisse à penser qu'il y aurait lieu de rechercher des réactifs moins fortement alcalins, car l'emploi de ces derniers *en excès*, pour l'extraction risque d'altérer fortement le produit et, par conséquent de diminuer beaucoup le rendement de l'opération.

CHAPITRE VI

COEFFICIENT D'ABSORPTION DES RADIATIONS ULTRA-VIOLETTES PAR LES ACIDES OXYPROTÉIQUES

L'absorption des radiations par les corps, donne des renseignements très précieux sur leur structure et leurs propriétés. Les solutions des acides oxyprotéiques étant incolores nous avons mesuré les coefficients d'absorption des radiations ultra-violettes.

Pour cette opération, nous avons utilisé une solution aqueuse dont la concentration convenable était : 1 gr. par 1000 cc.

Le spectrographe utilisé est un appareil à prisme de quartz de Jobin et Yvon. La source est un tube à hydrogène de Chalonge et Lambrey, donnant sous une tension de 2.000 volts en courant alternatif du secteur, le spectre continu ultra-violet.

Le fonctionnement du spectrographe a été décrit en détail par M. Vles.

La solution absorbante, de 1 cm. d'épaisseur, est contenue dans une cuve à faces parallèles en quartz. Cette cuve est placée en avant de la fente.

Un dispositif spectrophotométrique permet de comparer sur le même cliché, le noir photographique obtenu dans l'impression directe du faisceau lumineux d'intensité I_0 et dans l'impression d'un faisceau lumineux ayant traversé la cuve et d'intensité I.

On connait le cologarithme du rapport $\frac{I}{I_0}$; on cherche sur le cliché quelle est la longueur d'onde pour laquelle les noirs photographiques sont égaux ; on a donc la valeur de K pour cette longueur d'onde, K étant donné par la loi de Beer-Lambert :

$$\log \frac{I}{I_0} = -K\,cl.$$

$$K = \frac{1}{cl} \cdot \operatorname{colog} \frac{I}{I_0}$$

expression dans laquelle nous avons expérimentalement :

$$c = 10^{-3} \text{ et } l = 1 \text{ cm.}$$

Le tableau suivant donne la valeur de K en fonction de la longueur d'onde ultra-violette :

K	Ac oxyprotéique. pH : 12,20	Ac. alloxy. pH : 12,35	Ac. Antoxy. pH : 11,80
$\times 10^3$	$\lambda m\mu$	$\lambda m\mu$	$\lambda m\mu$
1	270	274	
0,9	274	285	
0,8	280	302	250
0,7	286	307	256
0,6	286	319	258
0,5	306	321	270
0,45	312	323	290

K	Ac. oxyprotéique pH. : 12,20	Ac. alloxy. pH : 12,35	Ac. Antoxy. pH : 11,80
0,4	312	325	295
0,35	326	330	299
0,30	332	332	300
0,25	332	340	307
0,20	336	355	320
0,15	338	368	360
0,10	343	430	380

Les courbes d'absorption ultra-violette, K coefficient d'absorption en fonction de la longueur d'onde, sont représentées dans le graphique (fig. IX). On voit que l'absorption ne commence guère que vers 350 mμ et qu'elle devient très forte à partir de 250 mμ.

Sans présenter de « bande » caractéristique d'absorption, on relève sur l'acide oxyprotéique (courbe II) trois régions d'accroissement assez brusque de l'absorption, pour λ : 362, 312 et 286 mμ. L'acide alloxyprotéique, au contraire, présente une absorption croissant régulièrement sauf dans la région 315 mμ où la perturbation est faible sinon négligeable (courbe I).

Il n'en est pas de même pour l'acide antoxyprotéique dont la courbe (III) offre une parenté évidente avec celle de l'acide oxyprotéique : les régions de variation brusque d'absorption situées à 286 et 312 mμ étant transportées à 255 et 295 mμ dans la courbe d'absorption de l'acide antoxyprotéique.

L'étude de l'absorption ultra-violette décelle donc une parenté assez étroite entre les acides oxyprotéique et antoxyprotéique ; alors que l'acide alloxyprotéique semble présenter un édifice moléculaire différent.

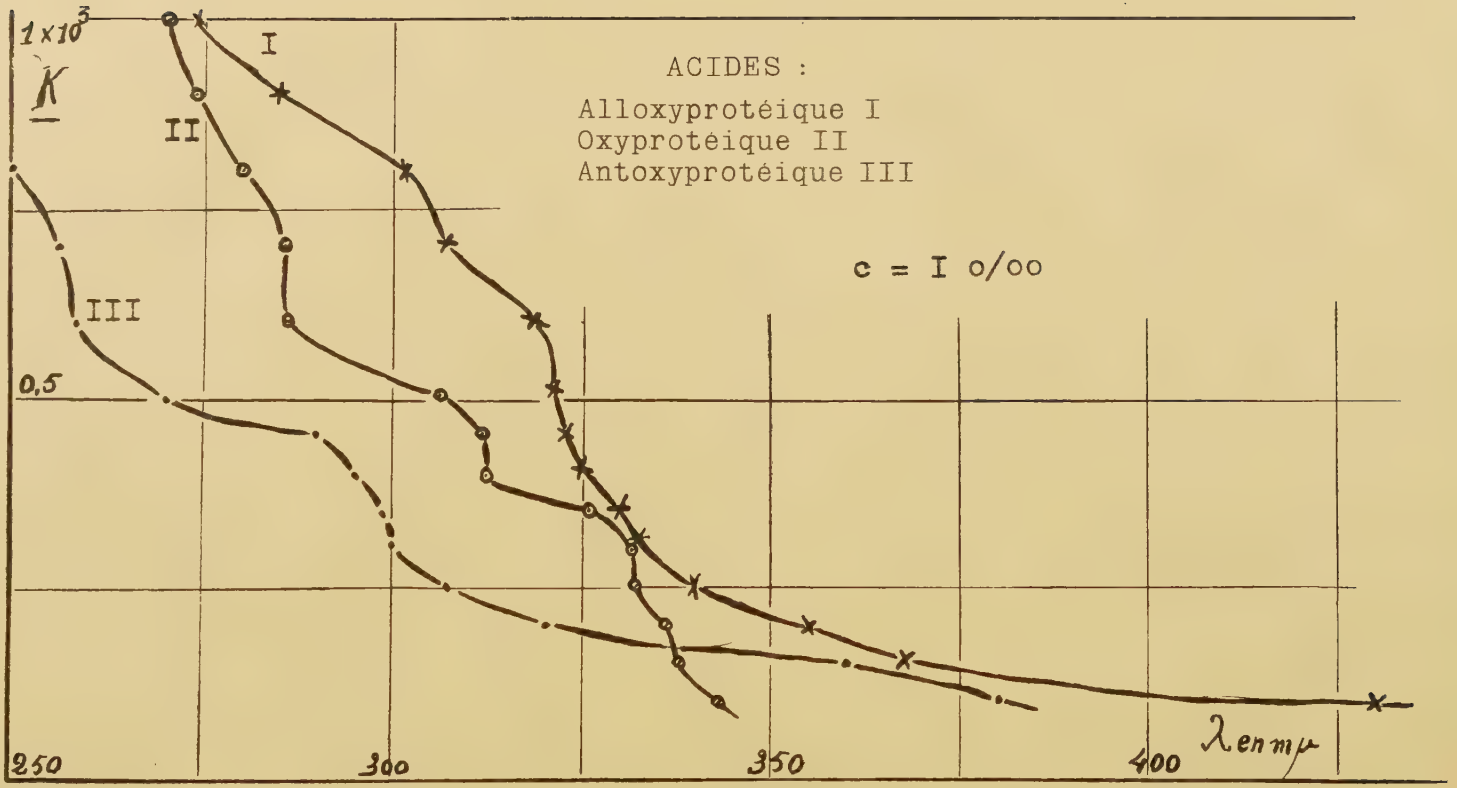
1×10³
K
I
II
III
ACIDES :
Alloxyprotéique I
Oxyprotéique II
Antoxyprotéique III
c = I o/oo
0,5
250
300
350
400
λ en mμ

Fig. IX.

Ajoutons enfin que la comparaison des courbes d'absorption obtenues avec des solutions à 3 gr., 1 gr., et 0 gr. 66 par litre, permet de penser que les acides oxyprotéiques en solution aqueuse présentent une absorption ultra-violette qui ne suit pas la règle de Beer-Lambert en ce qui concerne la variation de K en fonction de la concentration. On sait par ailleurs que c'est le cas pour la plupart des substances protéiques.

CONCLUSION

Les acides oxyprotéique, antoxyprotéique et alloxyprotéique, extraits des urines normales d'homme, de femme et d'enfant dont nous avons entrepris l'étude physico-chimique, nous ont donné les résultats suivants :

L'étude de la tension superficielle des solutions d'acides oxyprotéiques à Ph 6,5 ne nous révèle aucune anomalie.

L'examen des courbes de saturation obtenues par titration électrométrique, nous a fourni les pK suivants :

Acide oxyprotéique	Homme : 1,73 et 11,86 Femme : 2,14 et 11,56 Enfant : 2,76 et 11,89
Acide antoxyprotéique	Homme : 2,56 9, 45 et 10,66 Femme : L'insuffisance de produit ne nous a pas permis d'effectuer les mesures. Enfant : 2,96, 10,72et 11,25
Acide alloxyprotéique	Homme : 1,91, 9,43 et 12,18 Femme : 2,32, 8,83 et 11,48 Enfant : 2,46, 11,38 et 11,72

et les points isoélectriques apparents :

Acide oxyprotéique	Homme : 6,80 Femme : 6,86 Enfant : 7,32
Acide antoxyprotéique	Homme : 6 et 10 Femme : Enfant : 6,84 et 10,98
Acide alloxyprotéique	Homme : 5,67 et 10,80 Femme : 5,57 et 10,15 Enfant : 6,92 et 11,55

Par la cataphorèse, nous avons trouvé pour l'acide oxyprotéique un point isoélectrique vrai voisin de 7, conforme à celui fourni par la courbe de saturation (6,80).

Pour l'acide antoxyprotéique, un des points isoélectrique se trouverait voisin de 9,5 (10 dans la courbe de saturation).

L'acide alloxyprotéique présente un point isoélectrique voisin de 10 (10,8 sur la courbe de saturation).

D'après ces résultats nous avons donc conclu que :

Les acides oxyprotéiques comportent : des points isoélectriques vrais à des pH compris entre 7 et 7,3 ;

Une zone de neutralisation de la molécule à des pH compris entre 10 et 11 ;

Enfin, au delà de pH 11 on découvre une zone d'instabilité moléculaire avec possibilité de dégradation dans la molécule.

La mesure du coefficient d'absorption des radiations ultra-violettes par les acides oxyprotéiques nous a révélé que ces derniers ne suivent pas la règle de

Beer-Lambert en ce qui concerne la variation de K en fonction de la concentration.

Nous n'avons pas rencontré de « bande » caractéristique d'absorption.

Mais pour chaque acide nous relevons des régions d'accroissement de l'absorption. Pour l'acide oxyprotéique trois de ces régions se trouvent placées dans des valeurs de $\lambda = 332$, 312 et 286 mμ.

L'acide alloxyprotéique présente un accroissement à peu près régulier de l'absorption, sauf une légère perturbation aux environs de $\lambda = 315$ mμ.

Quant à l'acide antoxyprotéique, dont la courbe ressemble à celle de l'acide oxyprotéique, il présente des régions d'accroissement de l'absorption dans des valeurs de $\lambda = 255$ et 295 mμ.

BIBLIOGRAPHIE

1. St. Bondzynski, St. Dombrowski et K. Panek. Zeitung f. physiol. Chem., t. 46, p. 83-124, 1905. Présence d'acides oxy. antoxy. et alloxyprotéique dans l'urine normale de l'homme. Bulletin de la Soc. Ch. de France, t. 36, p. 528.

2. S. Edelbacher. Zeit. f. physiol. Ch., t. 120, p. 71-84, 1922. Sur les acides oxyprotéiques de l'urine : acide oxyprotéique.

3. S. Edelbacher. Zeit. f. physiol. Chem., t. 121, p. 164, 1922. Observation sur la composition de l'acide oxyprotéique.

4. S. Edelbacher. Zeit. f. physiol. Chem., t. 127, p. 186-189, 1923. Sur les acides oxyprotéiques de l'urine : II^{e} partie. Contribution à l'étude de l'acide antoxyprotéique.

5. S. Edelbacher. Zeit. f. physiol. Chem., t. 131, p. 177-178, 1923. Sur les acides oxyprotéiques : III^{e} partie. Contribution à la connaissance des acides oxyprotéiques.

6. Freund et A. Sittenberger-Kraft. Biochem. Zeitschr. t. 157, p. 261-262, 1925. Contribution à la connaissance des comp. urinaires : acides oxyprotéiques.

7. W. Giedroyc. Bulletin de la Soc. de Chimie Biologique, t. VIII, p. 222, 1926. L'acide oxyprotéique est-il un uréide ?

8. St. Bondzyndski. Bulletin de la Soc. de Chimie Biologique, t. VII, p. 61, 1925. Des acides oxyprotéiques et de leur rôle dans le métabolisme des albumines.

9. Bondzyndski et Zoja. Zeit. f. physiol. Chem., t. 19, p. 225, 1894.

10. Rona et Kluman. Praktikum der Physiol. Chem., t. II, Blut und Harn.

11. L. Hugounenq. Précis de Chimie physiologique et pathologique.

12. A. Morel. Précis de technique chimique, p. 426.

13. M. Fred Vlès. Précis de Chimie physique.

14. Mlle Y. Matthis. Étude électrométrique des protéines de la farine. Thèse de doctorat en pharmacie. Strasbourg, 1936.

15. Zeitschrift f. Physiol. Chem., vol. 58, p. 454-468, 1909. Dosage des acides oxyprotéiques dans l'urine.

16. Lafargue. Bulletin de la Soc. de Chimie biologique, t. 14, p. 1017, 1932.

17. Browinski et Dombrowski. Zeit. f. Physiol. Chem., t. 77, p. 92-106 (3, 1912). Recherches quantitatives sur la teneur en N aminé des acides oxyprotéiques de l'urine humaine.

18. Maly. Recherches sur l'oxydation de l'albumine au moyen de MnO^4K. Monat. f. Chemie, t. 6, p. 107 ; t. 9, p. 255-284.

19. M. Fred Vles Mesures effectuées sur les points isoélectriques des sérums pathologiques à l'Institut de Physique biologique (1929-1936)

20. M. Jarricot. Contribution à l'étude physico-chimique de certains états allergiques. Cellulies et points isoélectriques du sérum sanguin. Thèse de doctorat en pharmacie. Faculté de Lyon, juin 1934.

21. Arcand. Points isoélectriques des albumines. Doctorat en pharmacie. Paris, 1929-1930.

Vu :

Strasbourg, le 30 octobre 1937

Le Président du Jury,

Ch. LAPP.

Vu et approuvé :

Strasbourg, le 31 octobre 1937

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

A. SARTORY.

Vu et permis d'imprimer :

Strasbourg, le 4 novembre 1937

Le Recteur de l'Académie,

Président du Conseil de l'Université,

J. DRESCH

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION. 11

CHAPITRE PREMIER. — Généralités. Propriétés. Constitution.. 15

CHAPITRE II. — Extraction. 21

CHAPITRE III. — Tension superficielle des acides oxyprotéiques. 29

CHAPITRE IV. — Courbes de saturation. 33

CHAPITRE V. — Cataphorèse. 53

CHAPITRE VI. — Coefficient d'absorption des radiations ultraviolettes par les acides oxyprotéiques. 65

CONCLUSION. 71

IMPRIMERIE A. BONTEMPS, LIMOGES